Received:07.03.2024 | *Accepted: 15.03.2024*

Veterinary Sciences

doi: 10.31210/spi2024.27.02.16
UDC 636.932.3.09:616.995.132:591.111.11
ORIGINAL ARTICLE

Scientific Progress & Innovations
https://journals.pdaa.edu.ua/visnyk

27 (2)
2024

Morphological indicators of nutria blood during trichurosic invasion

E. Mykhailiutenko

Article info

Correspondence Author
E. Mykhailiutenko
E-mail:
eduard.mykhailiutenko@pdau.edu.ua

Poltava State Agrarian University,
Skovorody St., 1/3, Poltava, 36003, Ukraine

Citation: Mykhailiutenko, E. (2024). Morphological indicators of nutria blood during trichurosic invasion. *Scientific Progress & Innovations*, 27 (2), 95–98. doi: 10.31210/spi2024.27.02.16

It is generally accepted that the immune system plays an important role in the pathogenesis of almost any disease. Circulating phagocytes (neutrophils, monocytes) are the first to be involved in the development of an inflammatory reaction. The state of erythrocytopoiesis is a unique mechanism that occupies a dominant position in ensuring tissue respiration and stability of metabolic processes in the body. Laboratory blood tests are a primary indicator of changes in the body. On the territory of Ukraine, insufficient attention is paid to the study of morphological indicators in infested nutrias. Although based on research and analysis of publications, scientists claim that changes in erythrocytopoiesis indicate a pathological condition of animals. Therefore, the purpose of our work was to determine the effect of trichurises on the morphological indicators of sick semi-aquatic rodents. The work was carried out in the conditions of the farm "Dokuchaievskyi myslyvets" of the Poltava region. An experimental group of 8-month-old animals was formed, as well as a control group (eight heads each). Morphological indicators were studied according to generally accepted methods. The article summarizes the results of an experiment on the effect of trichurises on the composition of the blood of infested nutrias. It was found that parasitism in semi-aquatic rodents of the species *Trichuris myocastoris* causes changes in the general blood analysis: a decrease in the hemoglobin content by 15.05 %, and the number of erythrocytes by 19.37 %. A decrease in these indicators confirms the occurrence of anemia. At the same time, a decrease in leukocytes by 6.64 % may indicate a chronic course of the disease. As a result of the conducted morphological study of the uniform elements of nutria blood with a differential count of the leukocyte formula, a redistribution of the population composition of circulating leukocytes was established, caused by the maintenance / presence of the inflammatory process. A significant increase in the number of monocytes by 25.77 % was diagnosed. Therefore, the composition of the blood mutually determines the nature of the processes taking place in the nutria's body, and reflects the effect of trichurises perceived by it. The results of morphological studies of the blood of infested nutrias indicate significant changes in their body and confirm the mediated effect of the helminth.

Keywords: parasites, nutria, *Trichuris myocastoris*, hematological indicators, erythrocytes, leukocytes

Морфологічні показники крові нутрій за трихурозної інвазії

Е. В. Михайлютенко

Полтавський державний аграрний університет,
м. Полтава, Україна

Загальновизнано, що у патогенезі практично будь-якого захворювання важливу роль відведено імунній системі. Циркулюючі фагоцити (нейтрофіли, моноцити) першими включаються у розвиток запальної реакції. Стан еритроцитопоезу – це унікальний механізм, який займає домінуючу позицію у забезпеченні тканинного дихання й стабільності обмінних процесів в організмі. Лабораторні дослідження крові відносять до первинного показнику змін в організмі. На теренах України недостатньо уваги приділено вивченню морфологічних показників у інвазованих нутрій. Хоча на основі проведених досліджень і аналізу публікацій вчені стверджують, що зміни зі сторони еритроцитопоезу вказують на патологічний стан тварин. Тому метою нашої роботи було визначити вплив трихурисів на морфологічні показники хворих напівводяних гризунів. Робота виконана в умовах господарства «Докучаєвський мисливець» Полтавської області. Сформовано дослідну групу тварин віком 8 місяців, а також контрольну (по вісім голів у кожній). Морфологічні показники вивчали за загальноприйнятими методами. У статті узагальнено результати експерименту щодо впливу трихурисів на склад крові інвазованих нутрій. З'ясовано, що паразитування у напівводяних гризунів виду *Trichuris myocastoris* спричинює зміни у загальному аналізі крові: зниження вмісту гемоглобіну на 15,05, кількості еритроцитів – 19,37 %. Зниження даних показників підтверджує виникнення анемії. Водночас зниження лейкоцитів на 6,64 %, може свідчити про хронічний перебіг хвороби. У результаті проведеного морфологічного дослідження форменних елементів крові нутрій з диференційним підрахунком лейкоцитарної формули встановлено перерозподіл популяційного складу циркулюючих лейкоцитів, викликаний підтриманням / наявністю запального процесу. Діагностували вірогідне підвищення кількості моноцитів на 25,77 %. Отже, склад крові взаємообумовлює характер процесів, що протікають в організмі нутрій, й відображає дію трихурисів, яка ним сприймається. Результати морфологічних досліджень крові інвазованих нутрій вказують на істотні зміни в їх організмі й підтверджують опосередковану дію гельмінта.

Ключові слова: паразити, нутрія, *Trichuris myocastoris*, гематологічні показники, еритроцити, лейкоцити.

Бібліографічний опис для цитування: *Михайлютенко Е. В.* Морфологічні показники крові нутрій за трихурозної інвазії. *Scientific Progress & Innovations*. 2024. № 27 (2). С. 95–98.

Вступ

Нутрія (*Myocastor coypus*) – це гістрікоморфний гризун, що походить з Південної Америки, і належить до родини *Myocastorydae*. Люди впродовж століть традиційно полювали на даний вид тварини в її природньому ареалі для отримання хутра та м'яса. У 1922 році аргентинці спробували вирощувати нутрій у неволі, і ця практика поширилася у всьому світі. Зростаючий інтерес до екзотичного м'яса спричинив розповсюдження цієї тварини в багато країн світу для комерційного розведення. Нутрії добре пристосовані до різних умов і зараз розводяться як для отримання хутра, так і для м'яса. Підприємці запропонували привабливий і поживний делікатес. Харчову цінність м'яса нутрії висвітлено у численних публікаціях [1–5].

Згідно літературних даних у Південній Америці нутріям не загрожує зникнення у природньому ареалі. Фахівці контролюють чисельність популяцій. Разом з тим дослідники наголошують, що кількість нутрій може скоротитися через втрату їх середовища існування, внаслідок інтенсивного сільського господарства, аварій на дорогах, хижаків або надмірного полювання [6]. Водночас хвилювання викликають також хвороби. У даного виду тварин підтверджено наявність широкого спектра внутрішніх і зовнішніх паразитів [7–9]. Відомо, що з поміж найзагальніших ознак паразитизму виокремлюють зв'язок з організмом дефінітивного хазяїна.

Найважливішу роль у розвитку інвазійного захворювання відіграє фактор імунітету. Коли личинки та яйця гельмінтів потрапляють в організм тварини пероральним шляхом, вони піддаються впливу ферментів та неспецифічних захисних факторів організму, дії шлункового соку та місцевого імунітету кишечника. Ряд наведених факторів викликає загибель інвазійних елементів, та все ж частина їх таки проникає в кишечник. Паразит циркулює, досягає статевозрілих форм. Доведено, що опосередкований патогенний вплив гельмінтів та продуктів їх метаболізму (секрети, гормони, екскременти гельмінтів) відображається на фізіологічних процесах макроорганізму, морфо-функціональній характеристиці внутрішніх органів, тканин, у окремих випадках на поведінці тварин. Запальні реакції, дистрофічні й атрофічні процеси у паренхіматозних органах, втрата поживних речовин, стрес і зміни імунного стану – наслідки будь-якого паразитозу. На етапі гострого перебігу гельмінтозу зазвичай діагностують гіперактивність імунної системи: у хворих підвищується кількість фагоцитуючих клітин. Доведено, що вони відіграють важливу роль в ініціації імунної відповіді. Латентний етап зазвичай не супроводжується вираженими клінічними проявами. На етапі хронічного перебігу гельмінтозу тварин кількість фагоцитуючих клітин істотно зменшується [10–13].

Оскільки аналізи крові, виходячи з вищезазначеного, використовують для оцінки здоров'я та фізіологічного стану тварин, референтні значення необхідно встановити до того, як такі дані будуть доступні для інтерпретації [14–16].

До основних проаналізованих показників крові за паразитозів тварин належать: еритроцити, лейкоцити, тромбоцити і гемоглобін; визначаються їх параметри, розраховується лейкоцитарна формула (нейтрофіли, базофіли, еозинофіли, моноцити, лімфоцити) [12, 17, 18].

Отже, порівняно сталі референтні дані складу крові можуть змінюватися залежно як від виду паразита, інтенсивності інвазії, так і від виду, статі ураженої тварини, географічного розташування, клімату тощо [13, 19].

Мета дослідження

Метою наших досліджень було дослідити вплив *Trichuris myocastoris* на гематологічні показники інвазованих нутрій. У завдання досліджень входило провести морфологічне дослідження форменних елементів крові з диференційним підрахунком лейкоцитарної формули.

Матеріали і методи

Дослідження проводили упродовж осіннього періоду 2023 року на базі наукової лабораторії паразитології кафедри паразитології та ветеринарно-санітарної експертизи Полтавського державного аграрного університету. Експериментальні досліди виконували в господарстві «Докучаєвський мисливець» Полтавської області.

З метою визначення впливу трихурисів на гематологічні показники хворих гризунів сформовано дослідну групу віком 8 місяців (спонтанно інвазовані самці), а також контрольну (клінічно здорові) по вісім голів у кожній.

Тварини контрольної групи були спонтанно інвазовані збудником *Trichuris myocastoris* за інтенсивності інвазії 412±2,63 яєць/г фекалій.

Тварини контрольної групи були клінічно здоровими.

Морфологічні показники крові вивчали за загальноприйнятими методами [4, 20]. Статистичну обробку результатів експериментальних досліджень проводили шляхом визначення середнього арифметичного (M), його похибки (m) та рівня вірогідності (p) з використанням таблиці t-критеріїв Стьюдента.

Результати та їх обговорення

Лабораторні дослідження крові допоможуть охарактеризувати перебіг хвороби, їх відносять до первинного показнику змін в організмі. Оскільки за даними ряду авторів фізіологічні показники крові неотропних гризунів мають великий діапазон коливання, [7, 14, 21, 22], нами проведено роботу щодо визначення морфологічного складу крові здорових нутрій, в умовах Полтавської області.

За використання кількісного методу копро-овоскопічного дослідження нутрій контрольної групи виявлено, що ступінь інтенсивності інвазії в середньому по групі становив 412±2,63 яєць трихурисів/г фекалій. Нами встановлено, що за

вказаної інтенсивності інвазії у крові хворих тварин відбувалися зміни, порівняно з аналогічними у клінічно здорових. Аналіз отриманих результатів досліджень гематологічних показників хворих й здорових напівводних гризунів наведено в **таблиці 1**.

Таблиця 1

Гематологічні показники нутрій, інвазованих нематодами *Trichuris myocastoris* (M±m, n=8)

Показники		Група нутрій (самці)	
		контрольна	дослідна
Гемоглобін, г/л		116,25±2,71	98,75±2,39**
Еритроцити, Т/л		4,44±0,16	3,58±0,16**
Лейкоцити, Г/л		8,44±1,1	7,88±0,12*
Лейкограма, %			
Базофіли		–	–
Еозинофіли		1,88±0,37	1,25±0,21
Нейтрофіли	паличкоядерні	2,38±0,41	1,38±0,23
	сегментоядерні	39,38±0,83	41,38±1,43
Лімфоцити		53,5±1,09	52,13±1,38
Моноцити		2,88±0,37	3,88±0,16*

Примітки: * – P<0,05; ** – P<0,01– відносно показників контрольної групи тварин.

У даний час імунна система розглядається як регуляторна система, що забезпечує індивідуальність і цілісність організму. Основна ознака здоров'я – висока ступінь пристосування організму до змін, як зовнішніх, так і внутрішніх.

Визначення клітинного імунітету за цистицеркозу кролів є показовими, що доводять публікації ряду авторів. У інвазованих хутрових тварин відзначали збільшення кількості лейкоцитів на 9,64 % (6,37 Г/л), порівняно до показників у клінічно здорових тварин (5,81 Г/л). В лейкоформулі хворих кролів реєстрували еозинофілію (5,71 %, P<0,01, проти показників у контролі – 4,08 %). Водночас автори діагностували вірогідне збільшення кількості паличкоядерних нейтрофілів у 1,55 раза, що вказувало на запальні процеси в результаті перебування *Cysticercus pisiformis* в організмі тварини [23].

Оскільки основними ефекторними клітинами адаптивного імунітету є Т - і В-лімфоцити, то вчені продовжили аналізували показники клітинного імунітету крові кролів за впливу збудника пасалурозу. У хворих кролів, із різним рівнем інтенсивності інвазії, у порівнянні з аналогічними показниками здорових тварин, діагностували високу кількість лімфоцитів. Дослідниками доведено, що зміна субпопуляційного складу Т-лімфоцитів вказує на активацію захисних механізмів організму кролів, у відповідь на механічне пошкодження епітелію кишечника та продуктів життєдіяльності збудника *Passalurus ambiguus* [24, 25].

З доступних наукових літературних джерел відомо, що лише Д. О. Осадча та Г. А. Зон висвітлили у своїй роботі морфологічні зміни крові нутрій за мікстінвазій нутрій. Так, патогенний вплив асоційованого перебігу паразитозу (стронгілоїдозу, трихурозу, аскарозу та еймеріозу) на організм нутрій виражався в наступних змінах: зменшенні рівня гемоглобіну на 37,0 %, еритроцитів на 42,0 %, а лейкоцитів на 23,0 %. Зниження останнього показнику зафіксовано на фоні зростання кількості еозинофілів (62,0 %) та моноцитів (53,0 %) [26]. Автори зазначають, що асоціація паразитів в організмі нутрій призводить до пригнічення еритропоезу та лейкопоезу. Отримані дані узгоджуються із нашими результатами. Відмічено також тенденцію до зниження основних показників. Так, з'ясовано, що зменшилась концентрація гемоглобіну на 15,05, а кількість еритроцитів на – 19,37 % (P<0,01). Результати вищезазначених аналізів вказують на розвиток анемії, що є результатом постійного механічного пошкодження стінок кишечнику нематодами, оскільки збудників роду *Trichuris* віднесено до факультативних гематофагів. Незначне зниження лейкоцитів до 7,88 Г/л, (P<0,05) відповідно до контролю – 8,44 Г/л. Водночас необхідно відзначити, що проаналізовані гематологічні показники, на нашу думку, можуть бути використані, як додатковий інструмент у розумінні перебігу хвороби.

Разом з тим діагностовано перерозподіл популяційного складу циркулюючих лейкоцитів. Відомо, що провідне місце посідають нейтрофіли і моноцити, котрі опосередковують неспецифічну імунну реакцію [19, 27, 28]. Відбулося вірогідне збільшення порівняно до контролю рівня моноцитів на 25,77 % (P<0,05), що вказує на хронічний запальний процес, внаслідок порушення цілісності кишкового бар'єру й системної ендотоксемії.

Висновки

Наявність нематод *Trichuris myocastoris* в організмі нутрій істотно вплинула на показники еритроцитарної системи крові гризунів. Так, рівень гемоглобіну у дослідних тварин був вірогідно нижчим (98,75 проти 116,25 г/л), що означає меншу насиченість еритроцитів гемоглобіном. Водночас звертає на себе увагу тенденція до збільшення відносної кількості моноцитів на 25,77 %.

Перспективи подальших досліджень. У подальшому планується детальне вивчення біохімічних показників сироватки крові хворих нутрій за трихурозу.

Конфлікт інтересів

Автор стверджує про відсутність конфлікту інтересів щодо викладу та результатів досліджень.

References

1. Cawthorn, D.-M., & Hoffman, L. C. (2014). The role of traditional and non-traditional meat animals in feeding a growing and evolving world. *Animal Frontiers*, 4 (4), 6–12. https://doi.org/10.2527/af.2014-0027
2. Pokhyl, V., & Mykolaichuk, L. (2023). Features of interbreed crossing in nutria. *Agrarian Bulletin of the Black Sea Littoral*, 107, 76–83. https://doi.org/10.37000/abbsl.2023.107.11
3. Lustofin, K., Niedbala, P., Pawlicki, P., Tuz, R., Płachno, B. J., Profaska-Szymik, M., Galuszka, A., Stolarczyk, P., Gorowska-Wojtowicz, E., & Kotula-Balak, M. (2021). Senescent cells in rabbit, nutria and chinchilla testes – results from histochemical and immunohistochemical studies. *Animal Reproduction Science*, 226, 106701. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106701

4. Němeček, T., Tůmová, E., & Chodová, D. (2019). Effect of sex on growth, biochemical and haematological parameters of blood, carcass value and meat quality in nutrias (*Myocastor coypus*). Czech *Journal of Animal Science*, 64 (4), 166–173. https://doi.org/10.17221/193/2018-cjas
5. Saadoun, A., & Cabrera, M. C. (2019). A review of productive parameters, nutritive value and technological characteristics of farmed nutria meat (*Myocastor coypus*). *Meat Science*, 148, 137–149. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.10.006
6. Martino, P., Sassaroli, J. C., Calvo, J., Zapata, J., & Gimeno, E. (2007). A mortality survey of free range nutria (*Myocastor coypus*). *European Journal of Wildlife Research*, 54 (2), 293–297. https://doi.org/10.1007/s10344-007-0146-7
7. Martino, P., Radman, N., Parrado, E., Bautista, E., Cisterna, C., Silvestrini, M., & Corba, S. (2012). Note on the occurrence of parasites of the wild nutria (*Myocastor coypus*, Molina, 1782). *Helminthologia*, 49 (3), 164–168. https://doi.org/10.2478/s11687-012-0033-y
8. Martino, P. E., Radman, N. E., Gamboa, M. I., Samartino, L. E., & Parrado, E. J. (2018). Ectoparasites from some *Myocastor coypus* (Molina, 1782) populations (Coypus or Nutria) in Argentina. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 27 (2), 254–257. https://doi.org/10.1590/s1984-296120180026
9. Bollo, E., Pregel, P., Gennero, S., Pizzoni, E., Rosati, S., Nebbia, P., & Biolatti, B. (2003). Health status of a population of nutria (*Myocastor coypus*) living in a protected area in Italy. *Research in Veterinary Science*, 75 (1), 21–25. https://doi.org/10.1016/s0034-5288(03)00035-3
10. Gazzinelli-Guimaraes, P. H., & Nutman, T. B. (2018). Helminth parasites and immune regulation. *F1000Research*, 7, 1685. https://doi.org/10.12688/f1000research.15596.1
11. Sharma, N., Hunt, P. W., Hine, B. C., & Ruhnke, I. (2019). The impacts of *Ascaridia galli* on performance, health, and immune responses of laying hens: new insights into an old problem. *Poultry Science*, 98 (12), 6517–6526. https://doi.org/10.3382/ps/pez422
12. Mykhailiutenko, S., & Zhulinska, O. (2021). Morphological parameters of geese blood in amidostomy invasion. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies*, 23 (102), 105–109. https://doi.org/10.32718/nvlvet10216
13. Mohammed, M. (2016). The effect of *Cysticercus pisiformis* on the haematological and biochemical parameters of rabbits in Basrah province. *Life Science Archives*, 2 (2), 458–463.
14. Coppola, F., D'Addio, E., Casini, L., Sagona, S., Aloisi, M., & Felicioli, A. (2020). Hematological and serum biochemistry values in free-ranging crested porcupine. *Veterinary Sciences*, 7 (4), 171. https://doi.org/10.3390/vetsci7040171
15. Martino, P. E., Aráuz, S. M., Anselmino, F., Cisterna, C. C., Silvestrini, M. P., Corva, S., & Hozbor, F. A. (2012). Hematology and serum biochemistry of free-ranging nutria (*Myocastor coypus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 43 (2), 240–247. https://doi.org/10.1638/2010-0154.1
16. Genzer, S. C., Huynh, T., Coleman-Mccray, J. D., Harmon, J. R., Welch, S. R., & Spengler, J. R. (2019). Hematology and clinical chemistry reference intervals for inbred strain 13/n guinea pigs (*Cavia Porcellus*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 58 (3), 293–303. https://doi.org/10.30802/aalas-jaalas-18-000118
17. Ajith, Y., Dimri, U., Madhesh, E., Gopalakrishnan, A., Verma, M. R., Samad, H. A., Reena, K. K., Chaudhary, A. K., Devi, G., & Bosco, J. (2020). Influence of weather patterns and air quality on ecological population dynamics of ectoparasites in goats. *International Journal of Biometeorology*, 64 (10), 1731–1742. https://doi.org/10.1007/s00484-020-01952-7
18. Nogueira, B. C. F., da Silva Soares, E., Mauricio Ortega Orozco, A., Abreu da Fonseca, L., & Kanadani Campos, A. (2023). Evidence that ectoparasites influence the hematological parameters of the host: a systematic review. *Animal Health Research Reviews*, 24 (1), 28–39. https://doi.org/10.1017/s1466252323000051
19. Bernal-Valle, S., Teixeira, M. N., de Araújo Neto, A. R., Gonçalves-Souza, T., Feitoza, B. F., dos Santos, S. M., da Silva, A. J., da Silva, R. J., de Oliveira, M. A. B., & de Oliveira, J. B. (2022). Parasitic infections, hematological and biochemical parameters suggest appropriate health status of wild coati populations in anthropic Atlantic Forest remnants. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 30, 100693. https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2022.100693
20. Levchenko, V. I. (red.). (2015). *Vnutrishni khvoroby tvaryn*. Bila Tserkva [in Ukrainian]
21. Komárek, J. (1983). Některé biochemické a hematologické hodnoty krve nutrie [Biochemical and hematological values in the blood of the nutria]. *Veterinární Medicína*, 28 (6), 351–355.
22. Jelínek, P. (1984). Basic hematological indices in adult nutria (*Myocastor coypus* M.) males. *Acta Veterinaria Brno*, 53 (1–2), 41–47. https://doi.org/10.2754/avb198453010041
23. Duda, Y., Shevchik, R., & Kuneva, L. (2019). The effect of cysticercosis invasion on the cellular immunity of rabbits. *Scientific Horizons*, 81 (8), 36–41. https://doi.org/10.33249/2663-2144-2019-81-8-36-41
24. Duda, Yu., & Prus, M. (2019). Proteinogram and indicators of immunity during passalurosis of rabbits with different level of invasion intensity. *Ukrainian Black Sea Region Agrarian Science*, 23 (4), 61–70. https://doi.org/10.31521/2313-092X/2019-4(104)-7
25. Duda, Y. V., & Prus, M. P. (2019). Indices of cellular immunity in case of passalurosis of rabbits. *Bulletin "Veterinary Biotechnology"*, 35, 35–44. https://doi.org/10.31073/vet_biotech35-05
26. Osadcha, D. O., & Zon, H. A. (2016). Analiz hematolohichnoho ta biokhimichnoho doslidzhen za asotsiiovanoho perebihu helmintoziv ta eimeriozu nutrii. *Visnyk Sumskoho Natsionalnoho Ahrarnoho Universytetu: Seriia «Veterynarna Medytsyna»*, 6 (38), 152–155. [in Ukrainian]
27. Sharma, S., Katoch, R., Upadhyay, S. R., & Singh, R. (2022). Comparative haemato-biochemical profile of induced anchylostomiasis in healthy and diabetic murine model. *Experimental Parasitology*, 240, 108334. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2022.108334
28. Souza, D. S., Yang, S. G. N. S., Alves, A. C. A., Pontes, R. M., Carvalho, C. C. D., Soares, P. C., & Oliveira, J. B. (2021). Parasites and health status of free-ranging capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in the Atlantic Forest and Caatinga biomes of Brazil. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 23, 100503. https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100503

ORCID

E. Mykhailiutenko https://orcid.org/0009-0005-5581-636X

2024 Mykhailiutenko E. This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License http://creativecommons.org/licenses/by/4.0, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.